

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-505894

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)6月29日

(51)Int.Cl.⁶
A 61 K 38/21

識別記号
ABY
ADU

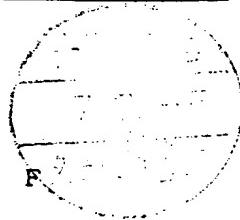
F I

C 07 K 14/52

8318-4H
8314-4C

A 61 K 37/ 66

ABY
ADU



審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁)

(21)出願番号 特願平5-518710
(86) (22)出願日 平成5年(1993)4月14日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)10月14日
(86)国際出願番号 PCT/US93/04471
(87)国際公開番号 WO93/21229
(87)国際公開日 平成5年(1993)10月28日
(31)優先権主張番号 868, 916
(32)優先日 1992年4月15日
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アムジエン・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320
-1789、サウザンド・オーツ、デハビル
ランド・ドライブ・1840、アムジエン・セ
ンター
(72)発明者 ブラット、ローレンス・エム
アメリカ合衆国、カリフォルニア・93003、
ペントウーラ、ノース・ブレント・ストリ
ート・389
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インターフェロンで病気を治療するための副作用の少ない方法および組成物

(57)【要約】

一般にインターフェロン治療に関わる重大な副作用を
引き起こすことなく細胞増殖障害、ウィルス性感染およ
び他の症状を治療する方法において、治療を必要とする
患者に治療上有効な量のコンセンサスヒト白血球インタ
ーフェロンを投与することを含む方法を開示する。また、
コンセンサスヒト白血球インターフェロンの医薬組成物
も開示する。

請求の範囲

1. インターフェロンにより治療可能な症状を有する患者を治療する一方で、インターフェロン投与に関わる1つ以上の副作用を減少または除去する方法において、該患者に治療上有効な量のコンセンサスヒト白血球インターフェロンを投与することを含む前記方法。
 2. 前記症状が、細胞増殖障害またはウィルス性疾患であることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 3. 前記ウィルス性疾患が、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎またはデルタ型肝炎であることを特徴とする請求項2に記載の方法。
 4. 前記ウィルス性疾患が、ヒト免疫不全ウィルス、ヘルペスウィルス、乳頭瘤、ポックスウィルス、ビコルナウィルス、アデノウィルス、ライノウィルス、HTLV-I、HTLV-IIおよびヒトロタウィルスから成る群から選択されることを特徴とする請求項2に記載の方法。
 5. 前記副作用が、頭痛、発熱、悪寒、吐気、食欲不振、抑うつ症および不眠症から成る群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 6. 細胞増殖障害がヘアリーセル白血病または慢性骨髓性白血病であることを特徴とする請求項2に記載の方法。
 7. 細胞増殖障害がカボジ肉腫であることを特徴とする請求項2に記載の方法。
 8. コンセンサスヒト白血球インターフェロンがIFN-con₁、IFN-con₂およびIFN-con₃から成る群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 9. コンセンサスヒト白血球インターフェロンがIFN-con₁であることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 10. コンセンサスヒト白血球インターフェロンが外因性DNA配列の原核生物による発現産物であることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 11. 治療上有効な量を、経口、静脈内、筋肉内、皮下、鼻腔内または病巣内投与することを特徴とする請求項1に記載の方法。
 12. コンセンサスヒト白血球インターフェロンの治療上有効な量が、患者一人につき 2×10^6 ～ 30×10^6 単位であることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 13. コンセンサスヒト白血球インターフェロンの治療上有効な量が、患者一人につき 6×10^6 ～ 15×10^6 単位であることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 14. 患者がヒトであることを特徴とする請求項1に記載の方法。
 15. さらに、治療上有効な量の化学療法剤を投与することを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。
 16. さらに、治療上有効な量のG-CSFを投与することを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。
 17. 治療上有効な量のコンセンサスヒト白血球インターフェロンおよび薬剤的に許容されるうる希釈剤、アジュバント、担体、保存剤または溶解剤を含んでなる組成物。
 18. コンセンサスヒト白血球インターフェロンがIFN-con₁、IFN-con₂およびIFN-con₃から成る群から選択されることを特徴とする請求項1～7に記載の組成物。
 19. コンセンサスヒト白血球インターフェロンがIFN-con₁であることを特徴とする請求項1～7に記載の組成物。
 20. コンセンサスヒト白血球インターフェロンが外因性DNA配列の原核生物による発現産物であることを特徴とする請求項1～7に記載の組成物。
- 以下を3に記載
- ことを特徴とする請求項1～7に記載の組成物。
21. 経口、静脈内、皮下、鼻腔内、筋肉内または病巣内投与に適する請求項1～7に記載の組成物。
 22. 注入可能な溶液または凍結乾燥粉末として供給される請求項1～7に記載の組成物。
 23. さらに、治療上有効な量のG-CSFを含む請求項1～7に記載の組成物。
 24. 1種以上の用量制限毒性を生じさせることなくインターフェロンを用いてウィルス性症状を治療する方法であって、治療を必要とする患者に治療上有効な量のコンセンサスヒト白血球インターフェロンを投与することを含む前記方法。
 25. 一般にインターフェロン治療に関わる重大な副作用を引き起こすことなく細胞増殖障害またはウィルス性感染を治療する方法であって、治療を必要とする患者に治療上有効な量のコンセンサスヒト白血球インターフェロンを投与することを含む前記方法。

明細

インターフェロンで病気を治療するための
副作用の少ない方法および組成物

本発明は、コンセンサスヒト白血球インターフェロンを使用して病気を治療する方法に関する。本発明はまた、病気を治療するのに適したコンセンサスヒト白血球インターフェロンの医薬組成物に関する。

発明の背景

インターフェロンは、抗ウイルス活性および抗増殖活性の両方を有するサイトカインのサブクラスである。生化学的特性および免疫学的特性に基づき、ヒトイントーフェロンは、インターフェロン- α （白血球）、インターフェロン- β （織維芽細胞）およびインターフェロン- γ （免疫性）の3種に分けられる。別個のアミノ酸配列を有する少なくとも14個の α -インターフェロン（サブタイプA～H）が、単離およびこれらのポリペプチドをコードするDNAの塩基配列決定により同定されている。 α -インターフェロンは、抗ウイルスおよび抗腫瘍性増殖抑制作用を有するため、効力のある治療薬としてかなり注目されている。

AとB、およびAとF）を含むハイブリド α -インターフェロン遺伝子の構造は、米国特許第4,414,150号、第4,456,748号および第4,678,751号に開示されている。

米国特許第4,695,623号および第4,897,471号は、天然に存在する α -インターフェロンのサブタイプのポリペプチドの間で各位置に存在する共通または主要なアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する新規ヒト白血球インターフェロンのポリペプチドを開示しており、これをコンセンサスヒト白血球インターフェロン(IFN-con)という。開示されたIFN-conアミノ酸配列は、IFN-con₁、IFN-con₂およびIFN-con₃と名付けられている。IFN-conをコードする製造遺伝子の合成および該遺伝子の大腸菌での発現も開示されている。

大腸菌で産生されるIFN-con₁の精製は、Kleinら(I. Chroaticol. 151, 205-215 (1988))に記載されている。この方法で精製されたIFN-con₁は、T98Gヒト細胞系を使用する細胞変性作用阻害アッセイで測定した比活性が 3×10^9 単位/mg蛋白であることが報告されている(Fitt et al.

全血のパフィニート画分から単離したヒト白血球からのインターフェロンの精製は、米国特許第4,503,035号に記載されている。この方法で製造したヒト白血球インターフェロンは、異なるヒト白血球インターフェロンのアミノ酸配列の混合物を含む。精製物質の比活性は、MDBK牛細胞系上で測定した場合は 0.9×10^8 ~ 4×10^8 単位/mg蛋白であり、Ag1732ヒト細胞系上で測定した場合は 2×10^6 ~ 7.6×10^8 単位/mg蛋白である。細胞変性作用の阻害アッセイを使用してインターフェロンの抗ウイルス活性を測定することが米国特許第4,241,174号に開示されている。測定されたインターフェロン活性は、米国国立衛生研究所(NIH)によるヒト白血球インターフェロンの参考基準に対して校正された。

ヒト白血球インターフェロンの少なくとも一部をコードする塩基配列を含む組換えDNAプラスミドの構築およびヒト白血球インターフェロンの免疫学的活性または生物学的活性を有するポリペプチドの大腸菌での発現は、米国特許第4,530,901号に開示されている。

異なるサブタイプの塩基配列の組み合わせ（例えば、AとD、

et al., J. Interferon Res. 9, 97-111 (1989)）。精製IFN-con₁は、等電点電気泳動での測定により3つのイソ型を含み、それらは、メチオニルIFN-con₁、デスマチオニルIFN-con₁およびN-末端がアセチル基でプロックされたデスマチオニルIFN-con₁と同定されている(Klein et al., Arch. Biochem. Biophys. 276, 531-537 (1990))。

α -インターフェロンは、現在、米国および他の国で、ヘアリーセル白血病、性病いば、カボジ肉腫（一般には、後天性免疫不全症候群（AIDS）患者を苦しめる癌）、および慢性非A非B型肝炎の治療に対して承認されている。2種類の α -インターフェロンが治療用途において承認されており、インターフェロン α -2aがRoferon-Aの商標で、インターフェロン α -2bがINTRON Aの商標で市販されている。Roferon-AおよびINTRON Aのアミノ酸配列は1つの位置で異なるが、他は、 α -インターフェロンのサブタイプ2（サブタイプA）のアミノ酸配列と同一である。

ラベルの指示の他に、 α -インターフェロンは、単独または、慢性骨髓性白血病、多発性骨髓腫、皮相膜脱癌、皮膚癌（基底

細胞癌および悪性黒色腫)、腎細胞癌、卵巣癌、悪性度の低いリンパ球性および皮膚性T細胞リンパ腫、ならびにグリオームなどの他の種々の細胞増殖性疾患における化学療法剤と組み合わせて使用または評価されている。α-インターフェロンは、肺、結腸直腸および乳癌で生じる充実性腫瘍の治療のための他の化学療法剤と組み合わせても有効であると考えられる(Rosenberg et al., "Principles and Applications of Biologic Therapy" in Cancer: Principles and Practice of Oncology, 3rd ed., DeVita et al., eds. pp. 301-547 (1989). Balmer DICP, AnnPharmacother 24, 761-768 (1990)).

α-インターフェロンは、正常および異常な細胞でのDNA複製ならびにRNAおよび蛋白質合成などの種々の細胞機能に影響を及ぼすことが知られている。すなわち、インターフェロンの細胞毒性作用は、腫瘍またはウィルス感染細胞に制限されず、正常で健康な細胞でも同様に示される。その結果、インターフェロン治療中、特に高用量を必要とする場合は、好ましくない副作用が生じる。インターフェロンの投与は骨髓抑制を招き、その結果、赤血球細胞、白血球細胞および血小板のレベルが低下する可能性がある。インターフェロンの用量が高いと、

通常は、インフルエンザ様の症状(例えば、発熱、疲労感、頭痛および悪寒)、胃腸障害(例えば、食欲不振、吐気および下痢)、めまいおよび嘔が出る。該治療の治療上の利点を少なくすることなく、インターフェロン治療の望ましくない副作用が減少または除去できれば有益である。

従って、本発明の目的は、インターフェロンでの治療が可能な症状の治療において、通常α-インターフェロン治療と関連づけられる望ましくない副作用が、現在実用化されている治療法と比較してかなり少ないと、完全に除去される治療である。本発明の別の目的は、現在実用化されている治療法と比較して、望ましくない副作用の頻度または程度の付随的増加が実質的ではなく、インターフェロンによる疾病的治療において高められた治療効果を達成することである。

発明の要旨

本発明は、哺乳類、好ましくはヒトに、治療上有効な量のコンセンサス(IFN-*c on*)ヒト白血球インターフェロン(IFN-*c on*)を投与することに係る、インターフェロンでの治療が可能な種々の症状の治療法を包含する。本発明は、IFN-*c on*が、α-インターフェロンの場合と同程度の副作用を患

者に引き起こさないという発見に基づくものである。本発明に従って治療可能な症状とは、一般に、α-インターフェロンによる治療に感受性の症状である。言い換えると、IFN-*c on*は、Intron(A登録商標)などのα-インターフェロンにより治療できる症状と実質的に同じ症状を治療するのに有用である。例えば、以下のものに限定されないが、細胞増殖障害およびウィルス性感染などの症状が挙げられる。IFN-*c on*は、癌と関連づけられことが多い細胞増殖障害の治療に有用である。そのような障害としては、以下のものに限定されないが、ヘアリーセル白血病およびカボジ肉腫が挙げられる。IFN-*c on*は、単独、または、癌および他の増殖性障害を治療するための他の治療薬と組み合わせて使用することができる。好ましい態様では、IFN-*c on*は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-3(IL-3)、インターロイキン-6(IL-6)、エリトロポエチンおよび幹細胞因子(SCF)などの骨髄細胞の増殖または分化を刺激する治療上有効な量の1種以上の因子とともに使用される。G-CSFが

IFN-*c on*との使用に好ましい因子である。

IFN-*c on*により治療可能なウィルス性症状としては、以下のものに限定されないが、A型肝炎、C型肝炎、他の非A非B型肝炎、B型肝炎、ヘルペスウィルス(EB、CML、单纯ヘルペス)、乳頭腫、ポックスウィルス、ビコルナウィルス、アデノウィルス、ライノウィルス、HTLV-I、HTLV-II、およびヒトロタウイルスが挙げられる。

上記症状がα-インターフェロンにより治療できることは以前に認められているが、そのような治療に伴う副作用のために、そのような治療の総合的な有用性はかなり限られる。エブスターインバーバル感染などの幾つかの場合は、α-インターフェロン治療に伴う副作用が、α-インターフェロンを使用する治療を実質的に不可能にしている。すなわち、本発明のための、IFN-*c on*により治療できる症状としては、α-インターフェロン治療が何らかの効力を示すが、其の副作用が治療による利益よりも勝るために、公知のインターフェロンでは治療不可能である症状を含む。本発明者らは、コンセンサスヒト白血球インターフェロン(IFN-*c on*)から選択される天然に存在しないインターフェロンによる治療が、α-インターフェ

ロンによる治療と比較して副作用は、質的に減少し、または除去することを見出し、本明細書に開示する。副作用の減少または除去は、期待どおり、治療される症状に関係なく実施される。IFN-conに対して見出された副作用の減少または除去は、公知文献で報告された結果に基づいて予想できるものではなかった。本明細書に示す実際の臨床結果は、IFN-conが α -インターフェロンと同じ用量レベルのときに副作用を減少または除去するだけでなく、用量の制限につながる副作用を起こすことなく3~5倍量のIFN-conを投与することができることを明らかに示す。

さらに、IFN-conは、以下に示すように、上述したINTRON Aと活性が同じであるか、より高い。特に、IFN-conは、INTRON Aより高い抗増殖活性を示す。従って、IFN-conを使用する細胞増殖障害の治療は、現在使われているインターフェロン治療と比較して、高められた効力および安全性を示す。治療上有効な量のIFN-conを投与すると、現在使われている方法と比較して、細胞増殖障害の治療は、より迅速に、またはより広範囲になり、関与する望ましくない副作用の頻度または程度の付随的増加は生じない。

10、50および100ngs/mlで添加した。

図8は、INTRON A、IFN-con₁またはIFN-con₁およびr-met GCSFで治療したカボチャ肉腫患者により達成された最初および現在のMTD中央値を示す。

発明の詳細な説明

本明細書において、コンセンサスヒト白血球インターフェロン(IFN-con)は、天然に存在しないポリペプチドを意味し、それは、天然に存在する全ヒト白血球インターフェロンサブタイプの塩基配列に共通するアミノ酸配列を主に含み、全サブタイプに共通のアミノ酸がない1個以上の位置では、主にその位置で生じるアミノ酸を含み、少なくとも1個の天然に存在するサブタイプのその位置には現存しないアミノ酸は含まれないものである。IFN-conは、以下のものに限定されないが、IFN-con₁、IFN-con₂およびIFN-con₃と名付けたアミノ酸配列を含み、それらは、米国特許第4,695,623号および第4,897,471号に開示されている。それらの全記載を参考として本明細書中に取り込むものとする。IFN-conをコードするDNA配列は、上記特許の記載または他の標準的方法に従って合成することがで

さらに、治療上有効な量のIFN-conは、現在使われている処方で使用されるインターフェロンの量より少ない可能性もある。その結果、場合によっては、用量を少なくしたIFN-conにより、高用量の他のインターフェロンと同じ治療効果が得られ、現在使われているインターフェロン治療に保わる望ましくない副作用は減少または除去される。

IFN-conは、抗増殖活性を有する、天然には存在しないポリペプチドである。好ましくは、IFN-conが、IFN-con₁、IFN-con₂またはIFN-con₃のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。最も好ましくは、IFN-conが、IFN-con₁のアミノ酸配列を有する。

本発明はまた、治療上有効な量のIFN-conを、適当な希釈剤、アジュバント、担体、保存剤および/または溶解剤とともに含む医薬組成物に関する。

図面の簡単な説明

図1~7は、ヘアリーセル(hairy cell)白血病の細胞系であるEsko Iに対するIFN-con₁および比較物質であるINTRON Aの抗増殖活性を示す。インターフェロンは、Esko I細胞懸濁物に、各々、0、1、0、5、1、5、

ある。

IFN-conポリペプチドは、好ましくは、製造したDNA配列を宿主細菌、特に大腸菌中に形質転換またはトランスフェクションして発現させた物質である。すなわち、IFN-conは、組換えIFN-conである。IFN-conは、好ましくは、大腸菌で产生して、当業者には公知の方法で精製する。IFN-con₁に関してはItayaら、上掲(1988)に一般的に記載されている。精製したIFN-conは、アイソフォームの混合物を含んでもよく、例えば、精製IFN-con₁は、メチオニルIFN-con₁、デスマチオニルIFN-con₁、およびN-末端がブロックされたデスマチオニルIFN-con₁の混合物を含む(Itayaら、上掲(1990))。あるいは、IFN-conは、特定の単離されたアイソフォームを含んでもよい。IFN-conのアイソフォームは、当業者に公知の等電点電気泳動などの方法で互いに分離される。

本発明は、 α -インターフェロンにより治療可能な症状を治療し、一般に α -インターフェロン治療に関わる1つ以上の副作用を減少または除去する方法であって、治療上有効な量の

IFN-con を患者に投与することを包含する前記方法を提供する。本発明の好ましい実施態様は、治療上有効な量の *IFN-con₁*、*IFN-con₂* または *IFN-con₃* を投与することを含む治療法である。最も好ましくは、治療上有効な量の *IFN-con₁* を投与する。

「インターフェロン投与に関わる 1 つ以上の副作用の減少または除去」は、当業者であれば明らかであり、理解できるものと考えられる。一般に、その副作用プロフィールがインターフェロンの種類によって異なるかどうかを決定するには、インターフェロン治療に関わる副作用の数および程度の種々の尺度を使用することができる。コンセンサスインターフェロンとの比較に適するインターフェロンは、INTRON (登録商標) A (インターフェロン α -2b、Schering-Plough 製) である。

副作用の程度を評価する便利な方法は、WHO (世界保健機構) により承認された標準スケールを使用するべきである。臨床医が現在広く使用しているスケールは、次に示す副作用の階級別レベルを利用したものである。すなわち、グレード I : 軽度；グレード II : 中度；グレード III : 重度；グレード IV : 生命に危険。これらの評価には若干の主観性が含まれるが、同

一の臨床医が患者の評価を行うならば、2つの薬の副作用の比較は有効であり、医者には許容され得ると考えられる。比較するために、医者は、ある薬のある用量レベルでの投与が用量制限毒性 (DLT) を招くかどうかを見ることが多い。DLT は、患者がある副作用に耐えられないと判断したときに発生する。これが発生すると、医者は用量を少なくする (Intron A またはコンセンサスインターフェロンの場合には、典型的には 3 ミリオン単位まで) か、一定の期間、薬の投与を止めた後、同用量または低用量で再び投与を行う。ともかく、DLTになると、その結果は、効力が最適より低い次善の治療法となる。すなわち、副作用の減少を現出する別の方法は、ある用量レベルでの DLT の減少数を参照することである。実施例 3 では、Intron A とコンセンサスインターフェロンとの間の DLT の比較を表す。副作用プロフィールの他の尺度も使用できるが、結果は同じであり、他のインターフェロン、特に Intron A および Roferon (登録商標) (Hoffmann-La Roche) などの α -インターフェロンと比較すると、コンセンサスインターフェロンの DLT は減少し、一般に、病気の治療に有用である全用量レベルで患者は良好である

と感じる。

IFN-con による治療に適する症状としては、種々の細胞増殖障害、特に種々の癌が挙げられる。これらの障害には、以下のものに限定されないが、ヘアリーセル白血病、カボジ肉腫、慢性骨髓性白血病、多発性骨髓腫、皮膚膀胱癌、皮膚癌（基底細胞癌および悪性黒色腫）、腎細胞癌、卵巣癌、悪性度の低いリンパ球性および皮膚性 T 細胞リンパ腫、ならびにグリオームが含まれる。

IFN-con による治療に適する他の症状としては、種々のウイルス性疾患がある。これらの疾患としては、^{以下を含む}に限定されないが、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎、非 A 非 B 型肝炎（B 型または C 型肝炎以外）、エブスタイン-バールウィルス感染、HIV 感染、ヘルペスウィルス (EB、CML、单纯ヘルペス)、乳頭瘤、ポックスウィルス、ピコルナウィルス、アデノウィルス、ライノ (rhino) ウィルス、HTLV-I、HTLV-II、およびヒトロタウィルスが挙げられる。

IFN-con は、単独、または本明細書に記載した症候の治療のための他の治療薬と併用して使用することができる。例えば、*IFN-con* は、治療上有効な量の、ブスルファン、

5-フルオロ-ウラシル (5-FU)、ジドブシン (AZT)、ロイコボリン、メルファラン、プレドニゾン、シクロホスファミド、ダカルバジン、シスプラチニンおよびジビリダモールなどの 1 種以上の化学療法剤とともに投与することができる。*IFN-con* はまた、インターロイキン-2 (IL-2) などのサイトカインとともに投与することもできる。

治療上有効な量の *IFN-con* は、インターフェロンによる治療中に認められる骨髄抑制の影響を打ち消すように骨髄細胞の分化を刺激する治療上有効な量の 1 種以上の因子とともに投与してもよい。そのような物質としては、以下のものに限定されないが、G-CSF、GM-CSF、IL-1、IL-3、IL-6、エリトロポエチンおよび SCF が挙げられる。幹細胞因子 (SCF) は、初期の造血前駆細胞の増殖を刺激し、米国特許出願第 573,616 号に記載されている。該特許出願は、参考として本明細書に取り入れる。

下記実施例 1 ~ 3 で、*IFN-con₁* がヘアリーセル白血病および AIDS 関連カボジ肉腫に対して有効な抗増殖剤であることを示す。

ヘアリーセル白血病細胞系である Esko I 細胞上で測

定した IFN-con₁ および INTRON A の抗増殖活性を実施例 1 に示す。IFN-con₁ の抗増殖活性が広い濃度範囲にわたって Intron A より大きいことがわかる。同様の結果が、IFN-con₁ を Roferon A と比較したときにも得られた。これらの結果は、IFN-con₁ を Intron A と同じ濃度で投与すると、治療効果がより大きいことを示す。あるいは、Intron A と同じ治療効果を示すには、低い濃度の IFN-con₁ でよい。

実施例 2 は、AIDS 関連カボジ肉腫の治療における IFN-con₁ と INTRON A との比較実験を記載する。IFN-con₁ を投与した患者の単位用量は、INTRON A を投与した患者より高かった。さらに、IFN-con₁ および GCSF の両方を投与した患者の IFN-con₁ 用量は、IFN-con₁ のみを投与した患者より高かった(図 8 参照)。この実験では、HIV 感染の治療の一部として、全患者に AZT を投与した。AZT のみの投与は、カボジ肉腫に対して効果がない。

IFN-con₁ は、IFN-con₁ を投与するとグレード 3 の毒性が減少することから判断して、INTRON A よ

り安全であることが示された。IFN-con₁ による治療は、INTRON A による治療と比較して好中球減少症および肝機能不全の発生率の減少を示し、IFN-con₁ および r-metGCSF による治療はグレード 3 の毒性を完全に除去した(表 2 参照)。

実施例 3 は、肝炎に感染した患者を含む臨床試験から得たデータを示す。

治療上有効な量の IFN-con を、薬剤的に許容されるうる担体、アジュバント、希釈剤、保存剤および／または溶解剤とともに含む医薬組成物も提供する。IFN-con の医薬組成物は、ある範囲の pH およびイオン強度を有する種々の緩衝液(例えば、トリス-HCl、酢酸塩、リン酸塩)、担体(例えば、ヒト血清アルブミン)、溶解剤(例えば、トウイーン、ポリソルベート)および保存剤(例えば、チメロサール、ベンジルアルコール)を含む。一般に、医薬組成物の成分は、インターフェロンおよび他の抗増殖剤または抗ウイルス剤とともに通常使用されるものから選択することができ、当業者であれば周知である。IFN-con の医薬組成物は、注入可能な溶液または、注入する前に適当な希釈剤に溶解する凍結乾燥粉末とし

て提供される。

IFN-con の治療上有効な量は、IFN-con 製剤の半減期、投与方法およびテストされる症状などの変数を考慮して、当業者により決定することができる。一般に、細胞増殖障害治療のための IFN-con の治療上有効な量は、患者一人当たり $2 \times 10^6 \sim 60 \times 10^6$ 単位の範囲で、1週間に数回投与される。その範囲の中で低い用量はヘアリーセル白血病の治療に有効であり、高い用量はカボジ肉腫の治療に適する。治療上有効な量の IFN-con により、好ましくは、少なくとも 6か月の間に、癌の特定の種類に依存して 20 ~ 80% の癌が覚解する。一般に、ウィルス性症状の治療のための IFN-con の治療上有効な量は、患者一人当たり $3 \times 10^6 \sim 30 \times 10^6$ 単位、好ましくは $6 \times 10^6 \sim 15 \times 10^6$ 単位の範囲で、1週間に数回(例えば、2 ~ 7 回、好ましくは 3 回)投与される。

投与方法は、好ましくは哺乳類の血液への注入により、その注入は、静脈内、筋肉内、皮下または病巣内である。経口投与または鼻からの投与でもよい。所与の医薬組成物の与えられた投与方法に対する適応性は、当業者であれば明らかである。

以下の実施例により、本発明をさらに詳しく説明するが、下記の実施例は本発明の請求の範囲を限定するものではない。

実施例 1

IFN-con₁ および Intron (登録商標) A の抗増殖活性

IFN-con₁ および Intron A の抗増殖活性を、Indiana University Medical School の Dr. E. Street により単離されたヘアリーセル白血病細胞系の Esko I 細胞系に対してテストした。Esko I 細胞の 3 ml 培養を 37°C、RPMI 培地(Gibco) 中、5% の CO₂ を含む 10% 牛胎児血清中で 12 時間、 1×10^5 細胞/ml でインキュベートした。IFN-con₁ または Intron A (インターフェロン α-2b; Schering Corp.) を添加して、100 μl の培地での最終蛋白質濃度を 0.1 ~ 100 ng/ml とした。IFN-con₁ の蛋白質濃度は、Bradford の蛋白質分析法(Bradford, Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976)) によって測定し、Intron A 濃度は、製造者提供の比活性(2×10^8 IU/mg 蛋白質) および単位濃度から計算した。生きた細胞数は、24 時間ごとに、トリパンブルー(Sigma)

取り込み量(実測値)は細胞生存数に比例した。

実施例2

カボジ肉腫(KS)患者に投与したIFN- α_1 の安全性、耐性および効力

IFN- α_1 の安全性および耐性を評価し、最大耐用量(MTD)を規定するために、ランダムなオープン標識実験(randomized, open-label study)を行った。IFN- α_1 およびIntron Aを各々、ジドブシン(AZT)とともに、AIDS関連KS患者に投与した。さらに、IFN- α_1 の安全性、耐性およびMTDは、AZTおよび、大腸菌産生による、ポリペプチドのアミノ末端にメチオニン残基を有する組換え顆粒球コロニー刺激因子(r-metGCSF)とともに投与したときも測定した。その実験の3つの処置群は次の通りであった。

1. Intron AおよびAZT
 2. IFN- α_1 およびAZT
 3. IFN- α_1 、AZTおよびr-metGCSF
- 各処置群は、少なくとも12人の評価可能な患者を含む。

の排除により測定した。100 μ IFN- α_1 またはIntron Aを24時間ごとに添加して、指示した最終濃度にした。生きた細胞数は、4回の独立実験の平均をとり、各実験は2本のサンプルを使用した。細胞数の変化は、24~48時間での約5%からより長い時間での約2%までの範囲であった。図1~7に示す結果は、種々の時間での、インターフェロンの存在下、または非存在下での生きた細胞数の割合を%で示したものである。

生きた細胞数は、IFN- α_1 またはINTRON Aの存在下でインキュベートしたEsko1細胞への³H-チミジンの取り込みを測定することにより確認した。120時間インキュベートした後、200 μ lの細胞懸濁物を取り出し、5 μ Ci/mlの³H-チミジン(Amersham)の存在下で、37°C、3時間インキュベートした。細胞を Cambridge細胞ハーベスター(Cambridge Technology)により集めて、蒸留水で7回、95%エタノールで2回洗浄し、取り込まれた³H-チミジンの量を液体シンチレーション計数により測定した。IFN- α_1 またはIntron Aの存在下で120時間インキュベートしたEsko1細胞による³H-チミジンの

A. 物質の説明

IFN- α_1 は、米国特許第4,695,623号および第4,897,471号に記載の方法を使用して大腸菌で產生した。IFN- α_1 は、Kleinら.上掲(1988)に一般的に記載された方法により精製した。この実験での皮下投与のために、IFN- α_1 は、リン酸ナトリウム緩衝液中での滅菌蛋白質溶液として供した。必要であれば、滅菌生理食塩水で希釈した。

ジドブシン(AZT)は、Burroughs-Wellcome Co.から購入し、そのパッケージに入っている指示に従って使用した。

Intron Aは、Schering Corp.から、滅菌した凍結乾燥組成物として購入した。これは、パッケージに入っている指示に従って希釈剤に再懸濁した。

r-metGCSFは、米国特許第4,810,643号に一般的に記載されている方法を使用して大腸菌で產生した。該特許は、参考として本明細書に取り入れる。r-metGCSFは、10mM酢酸ナトリウム、5%マンニトールおよび0.004%トゥイーン80における滅菌蛋白質溶液(pH4.0、濃度0.3mg/ml)として調製した。必要

であれば、滅菌した5%グルコース水溶液(D₅W)で希釈した。

B. 用量およびスケジュール

AZT: AZTは、全患者に100mgの固定用量で4時間ごとに経口投与した。毎日、目覚めている間に全5回の投与、すなわち500mgの用量である。

r-metGCSF: r-metGCSFを含む処置群に対して無作為に抽出した患者に対するr-metGCSFの用量は、1 μ g/kg体重/日であり、一回のボーラス(bolus)注射として皮下投与した。必要であれば、この用量を1 μ g/kg/日(6 μ g/kg/日を超えない)の量で増加したり、0.5 μ g/kg/日以下の量で減少したりして、5,000~15,000/mm³の絶対好中球数(ANC)目標範囲を達成した。

インターフェロン: 患者には、エスカレータ式用量計画に従ってIFN- α_1 またはIntron Aを投与した。用量は、等しい単位のどちらかのインターフェロンに基づいた。しかし、2つのインターフェロンの比活性は異なる(米国特許第4,695,623号に記載の抗ウィルス細胞障害分析によ

り測定すると、Intron A の場合は 2×10^3 IU/mg であり、IFN-con₁ の場合は少なくとも 1×10^9 IU/mg である。) ので、ある用量での蛋白質の量 (mg) は Intron A および IFN-con₁ で異なる。使用したエスカレータ式用量計画は、下記表 1 に示す。各用量レベル (IU) に対する蛋白質の量 (mg) も各インターフェロンに対して表 1 に示す。

表 1

Intron A および IFN-con₁ のエスカレータ式用量計画
用 量 用 量 × 蛋白質の量 (mg)
レ ベル 10⁶ IU INTRON A / IFN-con₁

レベル	10 ⁶ IU	INTRON A / IFN-con ₁
1	1	0.015 0.003
2	3	0.045 0.009
3	12	0.160 0.012
4	15	0.075 0.015
5	18	0.090 0.018
6	21	0.105 0.021
7	24	0.120 0.024
8	27	0.135 0.027
9	30	0.150 0.030

上記で示した 3 つの各処置群の患者に対して、IFN-con₁ または INTRON A の投与を用量レベル 1 でスタートし、1 週間毎日行った後、次に高い用量レベルに上げた。用量の増加は、8、15、22、29、36、43、50 および 57 日目に行った。増加は、各患者のインターフェロンの MTD または一日の最大用量が 30×10^6 IU に達するまで続いた。個々の患者の MTD は、用量制限毒性が生じる用量以下の用量レベルとして定義した。毒性は、WHO によって確立され、さらに Miller ら、Cancer 17, 210-211 (1981) に記載されている基準を使用して 0 (毒性なし) ~ 4 (急性毒性) にランク分けした。用量制限毒性は、少なくともインターフェロンに関連する可能性があると判断されるグレード 3 または 4 の不利な事象として定義した。24 時間未満の発熱および悪寒、疲労感、頭痛またはグレード 2 以下の毒性は、個々の患者に耐えられない症状であると決定されない限り、MTD の規定には使用しなかった。

用量増加期が終了すると、患者の MTD または達成されるならば 30×10^6 IU の最大用量で毎日投与することから成る維持治療を患者に対して続けた。維持治療は、病気の進み具合

や他の判定により患者の実験取り止めが是認されるまで続けた。

維持治療の間は、毒性の結果として 2 つのインターフェロンの用量減少が許可された。2 つの薬の用量減少の後は、さらにインターフェロンの用量を変えることができず、さらに減少する必要がある患者は、そのプログラムから外した。この方法の例外は、用量制限毒性が好中球減少症（約 1 週間のうちの 2 日間が ANC $\leq 1000/\text{mm}^3$ ）の場合であった。この場合は、インターフェロンの用量をさらに減少することなく患者の実験を続けたが、r-met GCSF を投与していない患者には、r-met GCSF 治療を $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日の皮下投与で開始した。すでに r-met GCSF の処置をした群の患者の場合は、r-met GCSF の投与量を次に高いレベルに増加した ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$ /日の増加)。

C. 患者の選択

合計 49 人の患者を実験に登録した。個々の患者は、包含および排除の全基準を満たした後にのみ登録される。包含のための重要な基準は、HIV 感染が血清学的に証明され、カボジ肉腫が皮膚および口に測定可能な病変を有して組織病理学的に確認され、免疫機能が許容可能であり (CD4 リンパ球レベルで

測定)、および AZT 治療が 1 年未満であることである。

患者が実験から除外される理由としては、用量増加期にグレード 3 以上の毒性が二次的に発生したり、個々の患者の MTD を測定した後に維持治療を施して用量制限毒性が三次的に発生したり、KS が悪化することが挙げられる。

D. IFN-con₁ および Intron A の MTD の測定

1 ~ 9 週間の実験、続く維持治療および適切であれば用量の減少の間、上述したエスカレータ式用量計画を使用して、3 つの処置群に対する INTRON A および IFN-con₁ の最初および現在の MTD 中央値を測定した (図 8 参照)。各群は 15 人の患者から成る。グループ 1 (Intron A および AZT) は、用量増加中の最初の MTD が 9×10^6 IU であり、現在の MTD は 6×10^6 IU であり、グループ 2 (IFN-con₁ および AZT) は、最初および現在の MTD が 15×10^6 IU であり、グループ 3 (IFN-con₁、r-met GCSF および AZT) は、最初および現在の MTD が各々、 24×10^6 IU および 21×10^6 IU であった。

E. Intron A および IFN-con₁ 治療の安全性の評価

Intron A および IFN-_{con}₁ 治療の安全性を、インターフェロン用量の減少を必要とする不利な影響の大きさによって求めた。結果を表 2 にまとめる。

表 2

3つの処理群において用量の低下を促す毒性

	発生率 (%)		
	Intron® A	IFN- _{con} ₁	+ r-metGCSF*
グレード 2 不耐性 (インフルエンザ様の症状)	20	70	65
グレード 3 好中球減少	40	10	0
グレード 3 肝機能テスト	30	10	0

* IFN-_{con}₁ ならびに IFN-_{con}₁ および r-metGCSF 处置群の値 (%) は、合計が 100% にならない。これは、これらの群の何人かの患者は、不利な影響を受けることなく 30×10^6 IU の最大用量に達したからである。

実験開始以後、明らかに Intron A または IFN-_{con}₁ の投与による毒性のために実験を外された患者はいない。

ランク付けされている：グレード I (軽)、グレード II (中)、グレード III (重) およびグレード IV (生命に危険)。タイプ I の IV の範囲に及ぶ。タイプ I のインターフェロン治療中の毒性が患者または医師によって我慢できないものであると判断されると、用量の減少または用量スケジュールの変更がなされる。これらの用量の変更は、次善の治療処方となり、その結果、効能は最適なものより小さくなる。コンセンサスインターフェロンは、最適の投与量を達成することができ、治療期間中、どんなグレードの用量制限毒性も伴うことなくそれを維持することができる。

コンセンサスインターフェロンを使用して慢性 C 型肝炎を治療するための臨床試験を開始して、いくつかの用量の効果を調べた。コンセンサスインターフェロンで治療した患者から得たデータを、同じ主要研究者がインターフェロン- α -2a (Rebetron®) またはインターフェロン- α -2b (Intron® A) で治療した、同様の病気で同様の人口統計的 (demographic) 特徴を有する患者から得たデータと比較した。

試験計画：その試験は、高められた（正常値の上限の少なくとも 1.5 倍）アラニントランスフェラーゼ (ALT：肝臓の

F. IFN-_{con}₁ および INTRON A 治療の効能の測定

抗腫瘍反応：抗腫瘍反応は、AIDS 臨床試験グループ (ACTG) 腫瘍学委員会の標準反応基準 (Trovato et al., J. Clin. Oncol. 7, 1201-1207 (1989)) を使用して、4か月の治療後に評価した。

免疫機能：CD4 リンパ球の計数を試験中の 6か月間、毎月行い、HIV 感染に対する患者の免疫反応を評価する。

3つの全処置群において、カボジ肉腫病変の反応と CD4 リンパ球レベルは同等であった。

実施例 3

C型肝炎 (HCV) 患者に投与した IFN-_{con}₁ の安全性、耐性および効能

改善された用量耐性：タイプ I のインターフェロンによる治療はいくつかの副作用を引き起こし、特定の病気の治療のために与えることができる絶対用量が制限される。これらの副作用としては、インフルエンザ様 (flu-like) 症状、下痢、骨髓抑制、高められた肝機能テストおよび精神状態の変化が挙げられる。これらの毒性は、WHO (世界保健機構) によって次のように

酵素) レベルを示す少なくとも 30 人の HCV 感染患者を含んでいた。この試験での正常値の上限は、35 mU/ml である。さらに、IFN-_{con}₁ の効能は、PCR 分析により抗ウイルス活性を測定し、また治療の間の ALT 値を測定することにより評価した。最後に、他の組換えインターフェロン- α 、特に組換えインターフェロン- α -2a (Rebetron®) およびインターフェロン- α -2b (Intron® A) の HCV 臨床研究から得られた歴史的データを、安全性および ALT 値の変化に関して、本試験で得られたデータと比較した。

適格な患者を、表 3 にまとめた IFN-_{con}₁ 用量コホート (cohort) の一つに入れた。

表 3

IFN- _{con} ₁ 用量 ミリオン単位 (MU)	投与回数 / 7 日	患者数
3	3	5
6	3	5
9	3	5
12	3	5
15	3	5

* 投与は少なくとも 48 時間間隔で行う。

用量コホート間は2週間間隔とし、逐次、用量コホートを登録した。特定的には、5人の患者を最初のコホートに登録し、*IFN- α 1*に起因するグレード III以上の毒性が認められない場合は、2週間の安全性を評価し、5人の患者は次のコホート(6MU)に登録した。しかし、*IFN- α 1*に起因するグレード III以上の毒性を有する患者が認められた場合は、さらに3人の患者を最初のコホートに登録して2週間評価した。*IFN- α 1*に起因するグレード III以上の毒性が認められない場合は、患者を次のコホート(6MU)に登録したが、*IFN- α 1*に起因するグレード III以上の毒性がさらに認められると、患者は次に高い用量コホート(6MU)には登録しなかった。9、12、15、18および24MUコホートへの段階的増大は、上述した規則と同様に進めた。さらに、どれかの用量レベルで二人以上の患者がグレード III以上の毒性にかかった場合は、そのコホートにさらに患者を登録しないで、そのコホートまたはより高い用量レベルでの試験治療をすでに受けている患者の用量を、グレード III以上の毒性が二人以上発生するレベル以下の用量レベルに下げた。しかし、別の患者も続けて(合計10人まで)、グレード III以上の毒

性が二人以上発生するレベル以下の用量レベルで登録してもよい。

いずれかのコホートの患者が、2週間の最初の評価中、またはその後に*IFN- α 1*に起因するグレード IIIの毒性にかかると、その毒性がグレード II以下に下がるまで*IFN- α 1*を差し控えた。次いで、治療を次に低い用量レベルで再開した。その患者がグレード IIIの毒性の際に3MU用量で投与されていたならば、治療を2MUで再開した。患者が*IFN- α 1*に起因するグレード IVの毒性にかかると、その患者は試験から除いた。患者は、試験治療中に3回の用量減少を受けることができた(2MUの用量レベル以下への減少はない)。毒性のために4回目の用量減少が必要な患者は、試験治療から除かれる。24時間未満の発熱および悪寒、疲労感、頭痛またはグレード II以下の毒性は、個々の患者にとって我慢ができないと決定されないならば、用量制限毒性とは考えなかった。裏は、(トレーニングが首尾良く終わった後)患者または第三者が家庭で投与した。

3か月で、ALTレベル変化に基づく反応に対して患者の評価を行った。

結果:

患者を上記コホートに入れて登録した。3、6、9および12MU用量群の場合、最初の2週間は、各々、用量制限毒性が認められなかった。最初の2週間の投与中に15MUが投与された患者一人に用量制限毒性が認められた。認められた毒性は、グレード IIの我慢できない「インフルエンザ様」症状であった。その患者は、用量を12MUに減少した。

コホートおよび従来の*IFN- α 2*の患者の各々に対する、12週間治療した場合の用量制限毒性は次の通りであった。

表 4

<i>IFN-α1</i> の用量 (ミリオン卖位)	DLT%	毒性
n=4	0	-
n=5	0	-
n=5	0	-
n=5	20%	「インフルエンザ様」
n=5	20%	「インフルエンザ様」
n=19 3 MU <i>IFN-α2</i>	32%	「インフルエンザ様」

上記表に示すように、一週間に3回、3~15MUの用量で

*IFN- α 1*を投与した患者は、*IFN- α 2*を投与した患者よりも用量制限毒性にかかる割合が小さかった。*IFN- α 2*は、この例では3MUまでしか実証されていないので、より高用量レベルの*IFN- α 2*での臨床的比較を行うことはできなかった。しかし、高用量レベルでのDLT数は、*IFN- α 2*の場合、かなり高くなると予想される。

表 5

12週間治療した後の反応

<i>IFN-α1</i> の用量 (ミリオン卖位)	反応率
n=4	25%
n=5	60%
n=5	80%
n=5	60%
n=4	75%
n=19 3 MU <i>IFN-α2</i>	47%

* 完全反応 + 部分反応

上記表に示すように、一週間に3回、3~15MUの用量で*IFN- α 1*を投与した患者のALT反応率は、少なくと

も、3MUのIFN- α 2で認められたものと同程度に良好であった。

上記に示すように、IFN-con₁による治療は、IFN- α 2による治療と比較して、好ましい効力を示し、薬剤耐性が大きい。

本発明を好ましい実施態様により説明したが、当業者であれば、変更および改善が可能であると理解される。従って、請求の範囲は、請求の範囲で規定した本発明の範囲内であるそのような同等の変更は全て含むものとする。

FIGURE 1

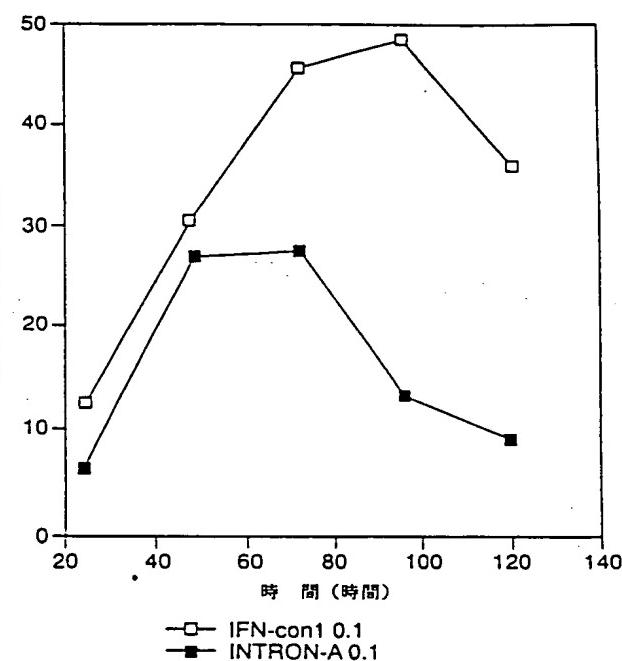


FIGURE 2

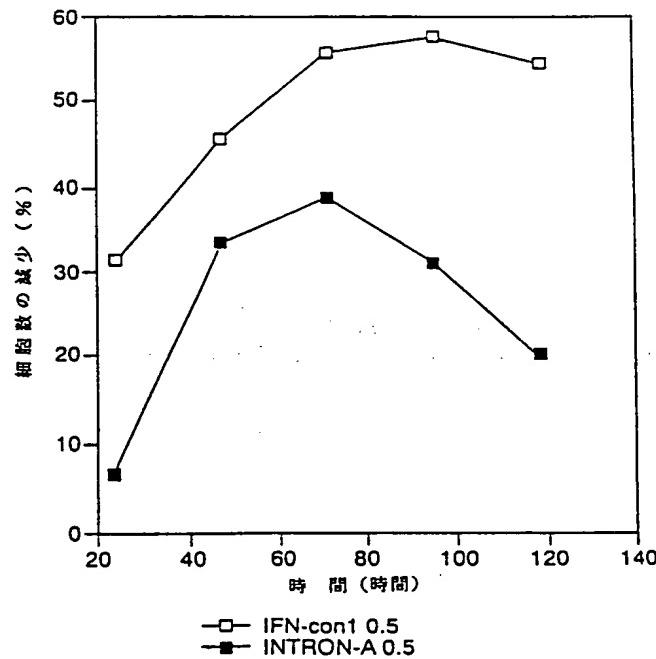


FIGURE 3

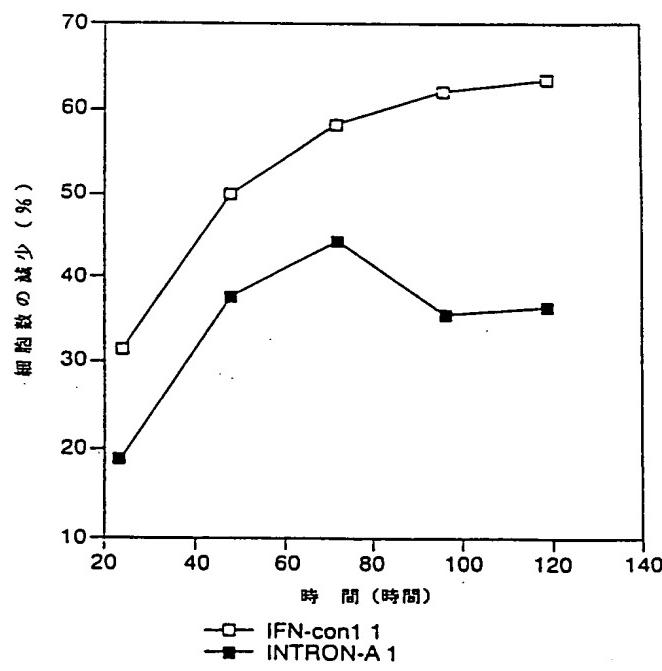


FIGURE 4

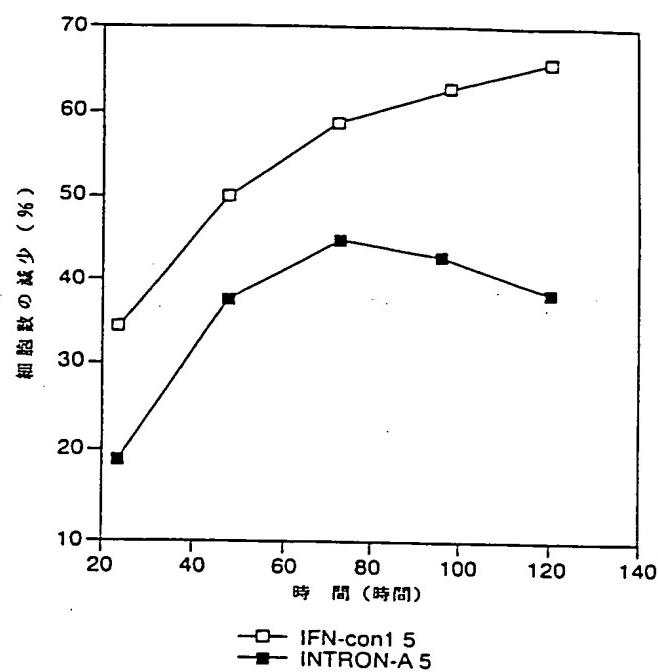


FIGURE 5

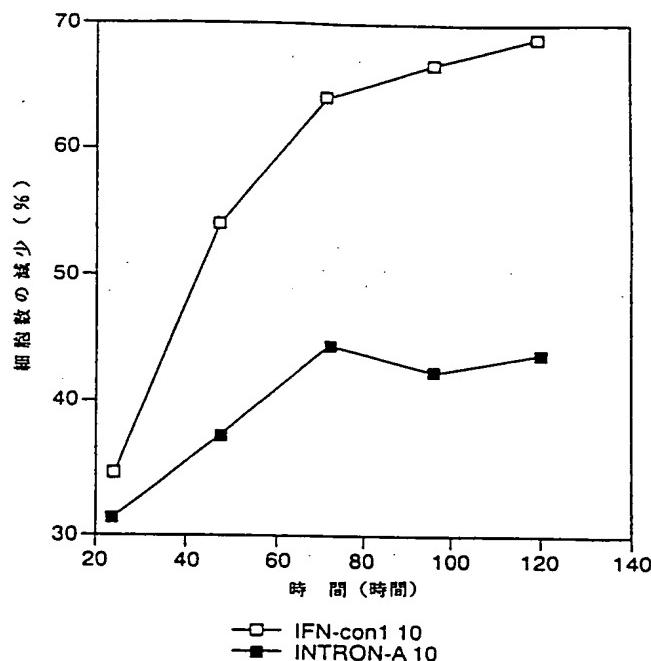


FIGURE 6

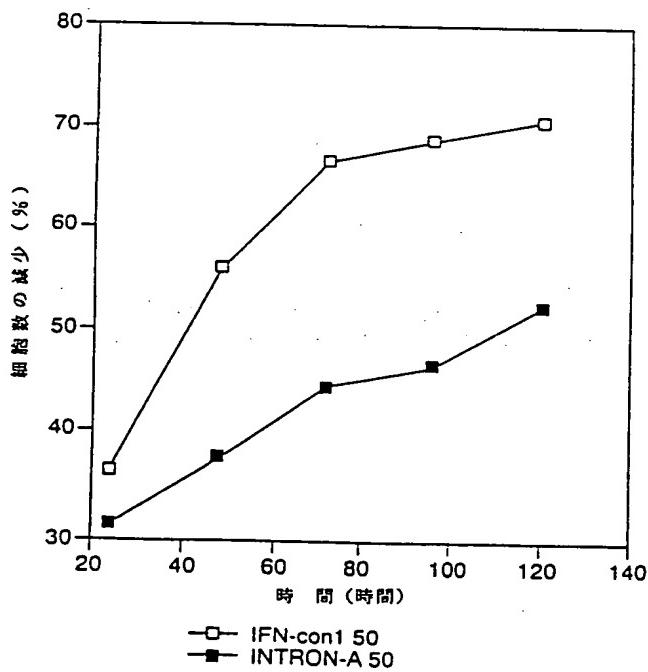
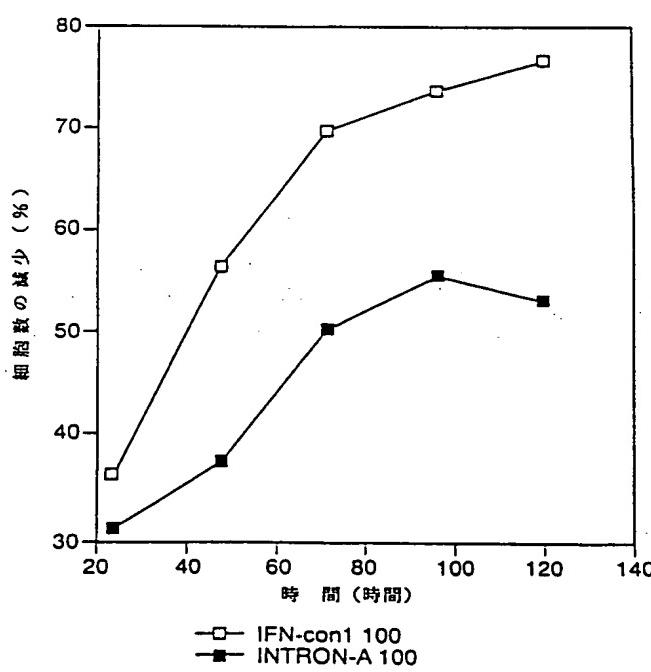
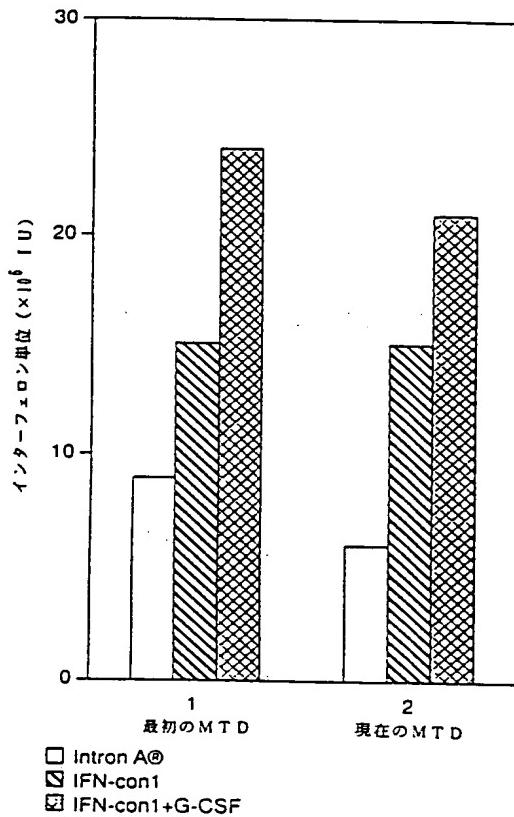


FIGURE 7



FIGURE



- Intron A®
- IFN-con1
- IFN-con1+G-CSF

International application No. PCT/US93/04471		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC5: C12K 13/00, 13/24 US CL: 530/231, 424/83.7, 43.6, 43.5 Assigning to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Materials documents searched (classification system followed by classification symbols) U.S.: 530/351, 424/83.7, 43.6, 43.5		
Documents searched other than documents mentioned to the extent that such documents are excluded in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, Dialog search terms: consensus interferon, anti-viral, cell proliferation		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to clause No.
X - Y	JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH, Volume 12, issued February 1992, G.N. Ozes et al., "A Comparison of Interferon-Con1 with Natural Recombinant Interferons- α : Antiviral, Antiproliferative, and Natural Killer-Inducing Activities", pages 35-39, see entire document.	18-22 1-17, 24, 25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family names.		
<p>*A: Original application or patent application filed in the country or organization whose name is indicated B: Document published after the international filing date or priority date and before the international publication date or entry into force of the international application C: Document published on or after the international filing date D: Document which was later made available prior to filing or before the international filing date or priority date of the international application E: Document referring to or cited in documents, inc. conditions or conclusions F: Document published prior to the international filing date but later than the priority date referred to G: Document containing the name of the same patent family</p>		
Date of receipt of the communication of the international search	Date of mailing of the International search report 04 AUG 1993	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231	Authorized officer SHELLY GUEST CERMACK Telephone No. (703) 308-0196	
Facsimile No. NOT APPLICABLE	Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)	

国際調査報告		
International application No. PCT/US93/04471		
C (Continuation): DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to clause No.
X - Y	JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, Volume 11, issued 03 April 1992, J.A. Glaspy et al., "Treatment of Hairy Cell Leukemia with Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Recombinant Consensus Interferon or Recombinant Interferon-Alpha-2b", pages 198-208, see entire document.	18-23 1-17, 24, 25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA,
CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, J
P, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL
, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SK, UA

(72)発明者 テイラー, ミルトン・ダブリュ
アメリカ合衆国、インディアナ・47401、
ブルーミントン、ブラウン・リッジ・ロー
ド・3712